

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-258239

(43)公開日 平成11年(1999) 9月24日

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/543
33/531

識別記号

5 8 3

F I

G 0 1 N 33/543
33/531

5 8 3

B

審査請求 未請求 請求項の数4 書面 (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平10-106868

(22)出願日 平成10年(1998) 3月13日

(71)出願人 390014960

シスメックス株式会社

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

(72)発明者 福田 滋弘

神戸市中央区港島中町7丁目2番地の1

東亜医用電子株式会社内

(74)代理人 弁理士 西野 卓嗣

(54)【発明の名称】 免疫凝集試験用試薬及び免疫凝集試験方法

(57)【要約】

【課題】 非特異的な反応をできるだけ増大させずに、特異反応のみを増大させることのできる免疫凝集試験用の水性溶媒を提供する。

【解決手段】 親水部に二糖鎖を有する非イオン性界面活性剤を反応液中に含有させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 親水部に二糖鎖を有する非イオン性の界面活性剤を含むことを特徴とする免疫凝集試験用試薬。

【請求項2】 以下の2液より構成される免疫凝集試験用試薬：

(a) 測定対象物に対する抗体あるいは抗原を感作した不溶性担体粒子を含む試薬、および、(b) 親水部に二糖鎖を有する非イオン性の界面活性剤を含む水性溶媒。

【請求項3】 界面活性剤の親水部の二糖鎖がマルトースあるいはシュクロースである請求項1または2記載の免疫凝集試験用試薬。

【請求項4】 親水部に二糖鎖を有する非イオン性の界面活性剤の存在下で抗原抗体反応を行わせることを特徴とする免疫凝集試験方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は生体試料中の生理活性物質を測定するための凝集試薬に関するものであり、特定の試料に含まれている特定の物質の量を定性あるいは定量するものである。この試薬は医学薬学をはじめ、

【0002】

【従来の技術】生体試料中の特定の物質を測定しようという試みは以前から盛んに行われている。生体試料中の特定物質を検出する方法としては、生体由来の特異的相互作用を利用する方法が知られており、その中でも抗原と抗体の親和性を利用した検出方法は現在臨床検査の分野を始めとして様々な分野で広く用いられている。

【0003】抗原抗体反応を利用した特定物質の検出法はイムノアッセイと呼ばれ、様々な測定原理によって抗原抗体反応の検出が可能になっている。その中の1つであり比較的古典的な方法に凝集反応がある。この方法では、抗原や抗体に比べると圧倒的に大きな不溶性の物質（粒子）に、抗原あるいは抗体を固定化して、測定対象物である生体試料と混合することによってそこで抗原抗体反応を生じさせる。この抗原抗体反応は不溶性物質の表面で起こり、抗体が複数個の抗原と結合しうる性質を有していることから、不溶性担体粒子の凝集が生じるという反応を測定原理としたものである。

【0004】不溶性担体粒子としては、現在までに赤血球を始め、炭素粉末、ゼラチン粒子など様々な素材が使われてきた。その中でもポリスチレンなどを材料としたラテックス粒子は、その粒径が均一である、表面状態が

物質の固定に好都合である、等の利点から幅広く利用されるようになってきた。

【0005】現在までにポリスチレンラテックスを利用した体外診断用医薬品としてはCRP測定試薬、便中ヘモグロビン測定試薬などがあり、測定装置としては、凝集の度合いを吸光度や散乱光でとらえる自動分析装置、凝集の程度をフロー中での前方散乱光強度でとらえる自動分析装置などが市販されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】近年、イムノアッセイの感度は飛躍的に向上しており、発光検出法を主体とする様々な高感度イムノアッセイが検討されている。ラテックス凝集法においても様々な高感度化が図られ、それなりの実績を上げてきている。しかしながらラテックスなどの凝集法は抗原抗体反応時に検体成分が存在するホモジニアスなイムノアッセイであり、高感度化は非特異反応の増大と表裏一体の関係になっている。実際、現在までに報告されている様々な増感剤（それらの多くは水溶性の高分子であり、例えばポリエチレングリコールやデキストラン等が挙げられる）は確かに抗原抗体反応の感度を上げる効果はあるものの、それと同時に非特異的な反応をも増大させるという欠点を有していた。

【0007】本発明は、非特異的な反応をできるだけ増大させずに、特異反応のみを増大させることのできる免疫凝集試験用の水性溶媒を提供することを目的とする。

【0008】

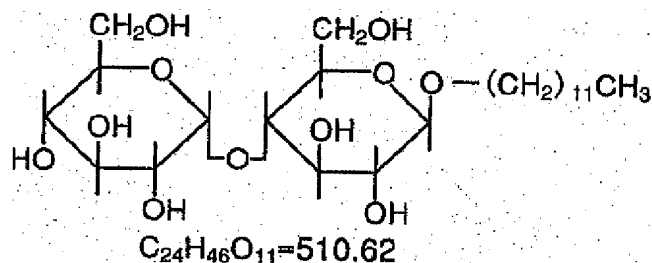
【課題を解決するための手段】我々は上記の問題を鑑み、増感剤に関して鋭意検討を行った結果、免疫凝集試験用試薬に、親水部に二糖鎖を有する非イオン性の界面活性剤を添加することによって、非特異反応を抑制し、特異反応を増大させることに成功した。

【0009】さらに、本発明の免疫凝集試験用試薬は、(a) 測定対象物に対する抗体あるいは抗原を感作した不溶性担体を含む試薬、および、(b) 親水部に二糖鎖を有する非イオン性の界面活性剤を含む水性溶媒、の2液構成とすることができる。

【0010】

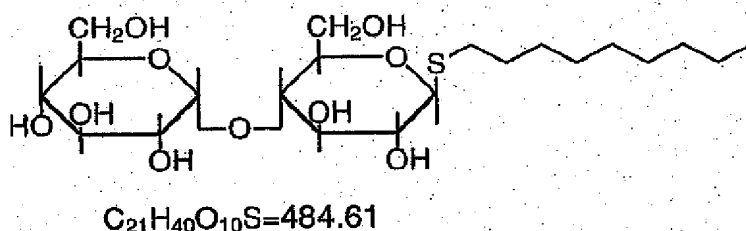
【発明の実施の形態】親水部に二糖鎖を有する非イオン性界面活性剤の例としては、n-ドデシル- β -D-マルトシド；

【0011】**【化1】**



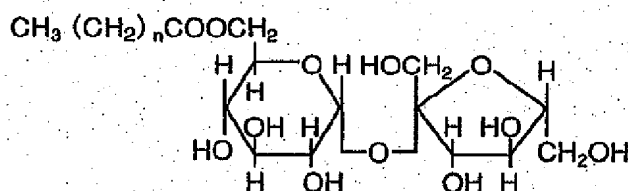
【0012】n-ノニル-β-D-チオマルトシド； * 【化2】

【0013】 * 10



【0014】シュクロースモノカプレート (n=8)、 * 【化3】

シュクロースモノラウレート (n=10)； * 20



(n=8) $C_{22}H_{40}O_{12}=496.55$

(n=10) $C_{24}H_{44}O_{12}=524.61$

【0015】等が挙げられる。n-ドデシル-β-D-マルトシド及びn-ノニル-β-D-チオマルトシドは、親水部がマルトースであり、シュクロースモノカプレート及びシュクロースモノラウレートは、親水部がシュクロースである。濃度については、測定項目によって至適濃度は異なるが、一応の目安としては、反応液全体として0.01～2.0w/v%、好ましくは0.05～1.0w/v%で使用できる。

【0016】本発明で用いられる水性溶媒としては、従来既知のあらゆる凝集試験用水性溶媒が使用でき、例えば、水、生理食塩水、各種緩衝液（リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、グリシン緩衝液、Tris緩衝液など）、アルブミン溶液、デキストラン溶液、正常ヒト及び動物血清溶液、合成高分子溶液等、およびこれらの組み合わせからなる溶液が例示される。当該水性溶媒のpHは、約6.0～8.5が好ましく、pHの調整は緩衝液で行われることが好ましい。水性溶媒の塩濃度は、測定に支障がない限りとくに制限されないが、生理的等張な溶液であることが好ましい。

★【0017】ここで凝集反応に用いる不溶性担体は、従来既知のものであれば何でも使用可能である。固定化した赤血球を始め、炭素粉末、ゼラチン粒子など従来の試薬に应用可能であるが、自動測定を可能に使用するためには、粒径の均一なラテックス粒子を使用するのが好ましい。

【0018】不溶性担体表面に結合する抗体あるいは抗原としては種々のものが使用可能である。

【0019】各動物種の抗体は、ラテックス表面に簡単に物理吸着させることが可能であることは周知の事実である。抗原あるいは抗体の固定化方法としては、物理吸着以外に、担体表面の官能基を利用する共有結合法も利用可能である。

【0020】凝集試験を行うにあたっては、本発明の非イオン性界面活性剤を含むラテックス懸濁液と試料とを混合して行うことができるが、あらかじめ本発明の非イオン性界面活性剤を含む反応緩衝液を試料に添加し混合してから、ラテックス懸濁液と反応させるのが好まし

【0021】測定方法は凝集法であるが、その検出方法には様々なものがある。最も古典的な方法は目視で凝集を確認する方法であるが感度も低く個人差が大きい。凝集の程度を吸光度の変化や散乱光の変化でとらえる方法も広く用いられており、自動測定装置も数多く開発されている。近年は、凝集した粒子をフロー中に流し、そこにレーザー光線を当てることによって、粒子から得られる前方散乱光強度を測定する装置が開発されている。粒子の凝集の程度により得られる散乱光強度には変化が生じ、個々の粒子の散乱光強度から凝集した粒子と凝集していない粒子とを区別でき、全体の凝集率を高感度に検出できる。この方法を用いれば試料中の微量の抗体を検出することができる。たとえば、東亜医用電子(株)のPAMIAシリーズでは、約10万個の粒子を計測後、その凝集率を凝集した粒子の数(P)とトータルとして計数した粒子数(T)の比(P/T)(%)で表わす。あらかじめ既知の濃度のキャリブレータを測定しておき、凝集率と濃度について検量線を作成しておけば、試料の凝集率からその試料中に含まれる測定対象物の量を定量することができる。

【0022】

【実施例】本発明を以下の実施例で説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

【0023】実施例1：ランリームAFPに対する増感作用

東亜医用電子(株)製のイムノアッセイ試薬、「ランリームAFP」(東亜医用電子(株)の商標)を用いてn-ドデシル-β-マルトシド、n-ノニル-β-D-チオマルトシド、シュクロースモノカプレートおよびシュクロースモノラウレートの増感作用を調べた。なお、東亜医用電子(株)の「ランリーム」試薬は、ラテックス試薬、反応緩衝液、キャリブレータ及び検体希釈液から構成される試薬キットである。本実施例及び以下の実施

例では、反応緩衝液に上述の非イオン性界面活性剤を添加し、測定を行なった。測定には同社製の免疫凝集測定装置(商品名:PAMIA-20)を用いた。

【0024】この装置は、測定試料10μl、ラテックス試薬10μl、反応緩衝液80μlを反応槽中で混合し、45℃で加温する。試薬混合後、約20秒と15分後の試料を抜き取り、その凝集率を測定し、それぞれT1、T2とする。凝集率は、P/T(%)の形で算出され、T2をあらかじめ求めておいた検量線に当てはめて濃度を算出する。

【0025】T1は、オーバーレンジ判定をするのに必要な測定である。検体中の目的物質の量が多いと、見かけ上凝集率が低下するという現象が起こる。このため、高濃度領域では目的物質の量を正確に測定することが困難になる。しかしながら、反応初期においては、そのような過剰領域においても凝集率の低下が見られないことを利用し、2回の測定を行っている。なお、この測定は本発明を実施する上では特に必要ではない。

【0026】使用試薬：

(ラテックス試薬の構成)

リン酸緩衝液(30mM, pH7.0)

抗AFP抗体感作0.8μmポリスチレンラテックス
0.05w/v%

(反応緩衝液の構成)

Tris-HCl緩衝液(50mM, pH7.0)

NaCl(塩類) 0.1M

BSA(ウシ血清アルブミン) 2w/v%

【0027】反応緩衝液中に各界面活性剤を0~0.5w/v%の濃度で添加し、検量線を作成した。その結果を表1に示す。

【0028】

【表1】

10

20

30

AFP			C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1-C0
	control	T2	0.48	0.51	1.07	3.37	13.36	37.32	50.31	0.03
n-Dodecyl- β -D-maltoside	0.10%	T2	0.49	0.69	1.80	6.77	22.61	46.00	53.65	0.20
	0.20%	T2	0.47	0.86	2.46	8.52	26.67	48.68	55.85	0.39
	0.30%	T2	0.57	0.88	2.44	7.95	25.44	47.96	55.44	0.31
	0.40%	T2	0.49	0.90	2.20	7.82	24.41	46.94	54.96	0.41
	0.50%	T2	0.47	0.89	2.18	7.41	24.10	46.16	54.39	0.42
n-Nonyl- β -D-thiomaltoside	0.10%	T2	0.44	0.58	1.45	5.16	18.77	43.35	52.80	0.14
	0.20%	T2	0.43	0.64	1.79	7.08	22.68	46.41	55.22	0.21
	0.30%	T2	0.47	0.86	2.25	7.87	25.60	47.76	55.40	0.39
	0.40%	T2	0.47	0.89	2.31	7.64	24.66	46.74	53.36	0.42
	0.50%	T2	0.55	0.96	2.06	6.73	21.85	44.61	52.30	0.41
Sucrose Monocaprate	0.10%	T2	0.49	0.54	1.18	4.66	17.12	41.39	53.22	0.05
	0.20%	T2	0.46	0.66	1.68	6.45	21.89	45.68	54.41	0.20
	0.30%	T2	0.41	0.71	2.11	7.40	24.32	46.82	55.49	0.30
	0.40%	T2	0.52	0.81	2.19	7.66	24.43	46.76	54.14	0.29
	0.50%	T2	0.51	0.78	2.06	7.00	22.40	45.30	52.48	0.27
Sucrose Monolaurate	0.10%	T2	0.40	0.67	1.67	6.47	21.52	45.95	53.83	0.27
	0.20%	T2	0.48	0.86	2.34	8.66	26.55	48.88	55.82	0.38
	0.30%	T2	0.46	0.85	2.38	8.28	25.55	48.20	54.04	0.39
	0.40%	T2	0.55	0.93	2.27	7.74	23.61	46.12	52.52	0.38
	0.50%	T2	0.53	0.81	2.19	7.25	22.65	44.42	51.68	0.28

【0029】検量線は界面活性剤の添加により変化した。感度の変化をC1-C0(7)P/Tで評価することにした。この数字を比較してみると無添加の0.03%に対してn-ノニル- β -D-チオマルトシドの0.4w/v%添加(反応液全体としては、0.32w/v%)が0.42%と最も大きな数字を示した。これ以外の界面活性剤においても、添加による増感効果は認められている。

【0030】この結果より、ラテックス凝集反応によるAFP測定において、親水部に二糖鎖を有する非イオン性の界面活性剤にはラテックス凝集に対する増感効果が存在していることが明らかとなった。

【0031】実施例2：ランリームFRNに対する増感作用

* 東亜医用電子(株)製のイムノアッセイ試薬、「ランリームFRN」(東亜医用電子(株)の商標)を用いて4種類の界面活性剤の増感作用を調べた。測定には同社製の免疫凝集測定装置(商品名:PAMIA-20)を用いた。

【0032】なお、ラテックス試薬として抗FRN感作ポリスチレンラテックスを用いた以外は実施例1と同じである。

【0033】反応緩衝液中に各種界面活性剤を0~0.5w/v%の濃度で添加し、検量線を作成した。その結果を表2に示す。

【0034】

【表2】

*

FRN			C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1-C0
	control	T2	0.25	0.48	1.19	4.06	13.95	37.58	61.43	0.23
n-Dodecyl- β -D-maltoside	0.10%	T2	0.26	0.52	1.35	4.62	15.52	39.77	62.62	0.26
	0.20%	T2	0.26	0.56	1.43	4.91	16.49	41.48	62.70	0.30
	0.30%	T2	0.30	0.63	1.56	5.42	18.22	43.59	63.24	0.33
	0.40%	T2	0.37	0.70	1.73	5.79	18.79	44.86	63.74	0.33
	0.50%	T2	0.50	0.81	2.03	6.29	19.56	44.98	64.57	0.31
n-Nonyl- β -D-thiomaltoside	0.10%	T2	0.24	0.51	1.28	4.44	15.15	39.54	62.27	0.27
	0.20%	T2	0.23	0.48	1.34	4.58	15.79	40.21	62.63	0.25
	0.30%	T2	0.23	0.53	1.41	4.88	16.34	40.92	63.09	0.30
	0.40%	T2	0.30	0.62	1.54	5.14	17.15	42.60	63.90	0.32
	0.50%	T2	0.32	0.68	1.62	5.21	18.09	43.43	62.88	0.36
Sucrose Monocaprate	0.10%	T2	0.24	0.48	1.37	4.91	16.07	41.39	63.61	0.24
	0.20%	T2	0.27	0.52	1.43	5.03	16.71	41.85	64.29	0.25
	0.30%	T2	0.27	0.58	1.49	5.19	17.43	42.24	62.85	0.31
	0.40%	T2	0.26	0.63	1.60	5.61	18.21	43.49	64.12	0.37
	0.50%	T2	0.35	0.66	1.78	6.01	19.17	44.30	64.07	0.31
Sucrose Monolaurate	0.10%	T2	0.28	0.57	1.40	5.17	17.75	43.05	63.15	0.29
	0.20%	T2	0.28	0.59	1.64	5.56	18.89	44.62	63.43	0.31
	0.30%	T2	0.28	0.72	1.74	6.19	20.88	46.12	62.67	0.44
	0.40%	T2	0.33	0.86	2.11	6.67	21.92	47.42	64.22	0.53
	0.50%	T2	0.55	0.99	2.37	6.99	22.51	48.26	65.29	0.44

【0035】検量線は界面活性剤の添加により変化した。増感の指標としてC1-C0の値に注目したところ、対照の0.23%に対してシュクロースモノラウレート0.4w/v%添加（反応液全体としては0.32w/v%）では、0.53%と増大していた。

【0036】このことは感度が増大していることを示すものであり、ラテックス凝集反応によるFRN測定において、親水部に二糖鎖を有する非イオン性界面活性剤に増感効果のあることがわかった。また他の界面活性剤においても程度の差はあれ、感度の上昇が見られた。

【0037】実施例3：ランリームTPに対する非特異抑制作用

東亜医用電子（株）製のイムノアッセイ試薬、「ランリームTP」（東亜医用電子（株）の商標）を用いて4種類の界面活性剤の非特異反応抑制作用を調べた。測定には同社製の免疫凝集測定装置PAMIA-20を用いた。

【0038】なお、ラテックス試薬に梅毒トレポネーマ（TP）菌由来の成分を感作したポリスチレンラテックスを用いた以外は実施例1と同じである。

【0039】反応緩衝液中に各種界面活性剤を0.1w/v%の濃度で添加し（反応液全体としては0.08w/v%）、検量線を作成した。その結果を表3に示す。*

20*【0040】

【表3】

親水部に二糖鎖を有する界面活性剤の効果
ヒラチンキ+ワレタ（ヒト）

		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1-C0
A	T2	0.44	0.58	0.89	1.73	3.93	8.84	18.25	0.14
B	T2	0.68	0.90	1.31	2.36	4.89	10.94	21.99	0.22
C	T2	0.80	0.79	1.02	2.07	4.59	10.43	21.38	0.19
D	T2	0.82	1.10	1.42	2.62	4.99	11.27	21.72	0.28
E	T2	0.77	0.89	1.23	2.13	4.35	9.63	19.66	0.12

A:無添加

B: n-Dodecyl- β -D-maltoside

C: n-Nonyl- β -D-maltoside

D: Sucrose Monocaprate

E: Sucrose Monolaurate

各界面活性剤の添加量は緩衝液中で0.1w/v%
界面活性剤以外の緩衝液組成は現行品と同じ

【0041】検量線は界面活性剤の添加により若干変化した。梅毒トレポネーマ（TP）試験では10SU/m1以上を陽性としているが、現在の試薬で陽性と判断されるが、他の方法では陽性と判断されない低値の陽性検体（非特異検体）について、界面活性剤の添加効果を調べた。増感効果の至適濃度が、界面活性剤を反応緩衝液に0.1w/v%添加したときであったので、この濃度で検討を行なった。

【0042】

【表4】

11

12

非特異検体

		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
A	T2	0.60	0.94	0.61	0.77	0.92	0.59	0.59	0.58	0.63	0.65
	conc	11.26	28.01	11.77	19.75	27.05	10.75	10.75	10.24	12.78	13.79
B	T2	0.53	0.88	0.47	0.54	0.72	0.54	0.66	0.46	0.52	0.60
	conc	0.00	8.95	0.00	0.00	2.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	T2	0.63	1.20	0.57	0.80	0.72	0.57	0.58	0.66	0.68	0.59
	conc	2.47	32.25	0.00	11.24	7.77	0.00	0.00	4.38	5.55	0.00
D	T2	0.66	1.15	0.62	0.64	0.84	0.70	0.64	0.74	0.60	0.77
	conc	0.00	12.62	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	T2	0.54	0.93	0.55	0.55	0.83	0.55	0.49	0.51	0.51	0.54
	conc	0.00	11.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

A:無添加

B: n-Dodecyl- β -D-maltosideC: n-Nonyl- β -D-thiomaltoside

D: Sucrose Monocaprato

E: Sucrose Monolaurate

各界面活性剤の添加量は緩衝液中で0.1w/v%

界面活性剤以外の緩衝液組成は現行品と同じ

【0043】界面活性剤の添加により1検体を除き測定値が低下し、その多くが陰性化し非特異反応が抑制されることが認められた。4種類の界面活性剤について調べたところ、効果の大小はあるが全ての界面活性剤で同様の効果が見られた。

【0044】このことから親水部に二糖鎖を有する非イオン性の界面活性剤は増感効果と共に非特異抑制効果を併せ持つ物質であることが明らかとなった。このような*

*物質は現在までのところ見つかっていない。ラテックス凝集には非常に好都合な物質である。

【0045】

【発明の効果】本発明によれば、親水部に二糖鎖を有する非イオン性の界面活性剤を抗原抗体反応系に存在させることによって、感度を増大させることができる。また、それだけでなく、非特異反応を増大させずに特異反応のみを増大させることができる。